

Die Vorteile der Membranfiltermethode
in Verbindung mit Nährkartonscheiben,
sowie die Anwendung
eines transportablen Filtergerätes
für bakteriologische Wasseruntersuchungen

von

HEINRICH WILHELM KASTER

1958

Aus dem Hygiene- Institut
der Johannes Gutenberg- Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. med. Heinrich Kliewe

Die Vorteile der Membranfiltermethode in Verbindung mit
Nährkartonscheiben, sowie die Anwendung eines transportablen
Filtergerätes für bakteriologische Wasseruntersuchungen

Inaugural- Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes Gutenberg- Universität Mainz

vorgelegt von
Heinrich Wilhelm Kaster
Assistenzarzt aus Mainz

1 9 5 8

D e k a n : Professor Dr. med. U. K ö t t g e n

Referent : Professor Dr. med. H. K l i e w e

Datum des Diploms 9. Mai 1958



Meinen lieben Eltern

aus Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Einleitung	5
I. Entwicklung der Membran-Filter	7
II. Vorteile der Membran-Filter-Methode gegenüber den älteren Wasserunter- suchungsverfahren	10
III. Chemische und physikalische Eigen- schaften der Membran-Filter	17
IV. Nährböden-Nährkartonscheiben "Isopor-Water Laboratory" Beschreibung und Handhabung	21 28
VI. Vergleichsuntersuchungen von Bakterien-Reinkulturen, sowie Rhein- und Nahewasserproben auf deutschen und amerikanischen Membran-Filtern und Nährkarton- scheiben.	34
VII. Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	
Lebenslauf	

EINLEITUNG

Die bisher üblichen Wasseruntersuchungsmethoden erfordern einen wesentlichen Zeitaufwand und leisten zahlreichen Fehlermöglichkeiten Vorschub, weil die Verarbeitung des Wassers seither nicht am Entnahmeort, sondern erst später im Labor erfolgen konnte. Durch den damit häufig weiten und zeitraubenden Transportweg traten wesentliche Keimzahlverschiebungen - besonders in wärmeren Jahreszeiten - auf.

Weiterhin konnten die Wasseruntersuchungen nur in speziell dafür eingerichteten Laboratorien durchgeführt werden. Zahlreiche Spezialnährböden waren hierfür notwendig und besonders der E. coli-Nachweis ließ sich vielfach nur stufenweise bestimmen, so daß diese Untersuchungen Tage in Anspruch nahmen. Ein weiterer Nachteil der klassischen Wasseruntersuchungsverfahren bestand darin, daß der Nachweis von E. coli nur in kleinsten und kleineren Wassermengen erfolgen konnte. Es war deshalb seit jeher ein dringendes Bedürfnis, die Methode der bakteriellen Wasseruntersuchung als solche zu vereinfachen, um

1. die Wasseruntersuchung sofort an Ort und Stelle der Entnahme,
 2. größere Wassermengen,
 3. in einem kürzeren Zeitraum und
 4. unter konstanten Nährbodenverhältnissen durchzuführen.
- Hierfür wurde die Membranfiltermethode (= MFM) und ein transportables Filtergerät entwickelt. Dieses Verfahren ermöglicht, unabhängig von einem spezialausgerüsteten Labor Untersuchungen anzustellen. Außerdem sind für diese Untersuchungsmethode keine entsprechend vorgebildeten Fachkräfte notwendig. Die MFM ist einfach und leicht erlernbar.

Es sind in der letzten Zeit deutsche und amerikanische Membranfilter (= MF), sowie Spezialnährböden auf Kartonscheiben vorwiegend zum Nachweis von E. coli entwickelt worden.

Meine Aufgabe ist es, die Brauchbarkeit des Filtergerätes und den Unterschied zwischen Filtern deutscher und amerikanischer Herkunft und den dazugehörigen Nährkartonscheiben hinsichtlich ihrer Leistung zu untersuchen.

I. Entwicklung der Membran-Filter-Methode

Poröse Membranen, die chemisch aus Zelluloseabkömmlingen bestehen, wurden vor einigen Jahrzehnten von deutschen Forschern entwickelt. So stellte 1891 SANARELLI (1) Kolloidmembranen her. Diese waren undurchgängig für Bakterien, aber permeabel für deren Toxine. Um 1900 wurde ein Filter von MONTEFIORI (2) als Säckchen oder Häutchen benutzt. Der Nachteil war nur der, daß eine bestimmte Porengröße des Filters nicht eingehalten werden konnte.

Während des ersten Weltkrieges entwickelte 1917 ZSIGMONDY u. BACHMANN (2) Filter mit fast gleichmäßiger Porengröße, sowie ein Filtrationsgerät für Heereszwecke, um keimfreies Wasser herzustellen. Nitrozellulose, Aceton und deren organische Lösungsmittel goß man auf Glasplatten aus. Das Lösungsmittel ließ man verdampfen; zurück blieb ein dünnes, weißes Häutchen aus Nitrozellulose, das Membranfilter (=MF). Seit dieser Zeit werden solche Filter fabrikmäßig hergestellt.

CITRON (2) wies mit diesen Filtern Tbc-Keime im Harn nach und EICHHOFF (3) benutzte 1921 diese Filter, um Bakterien der Coli-Gruppe im Wasser zu untersuchen. Es gelang ihm auch, in größeren Wassermengen zu verlässlicheren und genaueren Ergebnissen zu kommen. Er filtrierte u.a. auch Typhusbakterienaufschwemmungen durch MF und fand in 1/1000 Normalöse Typhuskultur in 10 Liter Wasser Typhuskeime(2). Er beobachtete aber auch, daß bei *B. prodigiosum* und Schweinerotlaufbakterien ein keimfreies Filtrat nur für kurze Zeit erreicht werden konnte und daß die Keime nachher das Filter durchwandern. Gelöste Endo- und Diphtherietoxine passieren die Filter ohne Minderung ihrer Toxizität. Ebenso lassen sich auch Antitoxine ohne Nachlassen ihrer spezifischen Wirkung filtrieren.

FICKER (4) prüfte vergleichend außer den MF auch andere gebräuchliche Filter, um Gasödembazillen von den durch sie in einem flüssigen Nährmedium entstandenen Toxinen zu trennen. Das Filtrat blieb bei den MF keimfrei; der Toxingehalt aber erhalten. Asbestfilter lieferten nicht immer keimfreie Filtrate, schädigten aber auch nicht die Toxine. Kreidefilter hielten Bakterien als auch deren Toxine zurück. Berkefeldfilter absorbierten zum Teil die Toxine.

BECHHOLD (1, 2) stellte erstmals eine umfassende Arbeit über die physikalisch-chemische Natur der MF zusammen und prüfte mit Hilfe des Blasen-Druckverfahrens die Porengröße der MF.

W. J. ELFORD in England und P. GRABAR (1) in Frankreich entwickelten um 1930 ein Verfahren zur Herstellung der Kolloidmembranen mit einer kontrollierbaren Porengröße.

Außer in Rußland und Deutschland bestand während dieser Jahre kein Interesse im Gebrauch der MF. Es wurden MF hauptsächlich in der analytischen Chemie zur quantitativen Bestimmung kolloidaler Fällungen nutzbringend verwandt. JANDER (4) und HOFFMANN (4) berichten darüber.

Im allgemeinen interessierte damals bei der Filtration zuerst mehr das Filtrat als der Filtrationsrückstand auf der Filteroberfläche. Es war nämlich durch die Filtration die Möglichkeit gegeben, sterile und gereinigte Filtrate zu gewinnen. So bediente sich HOFFMANN (5) dieser Methode zur Reinigung und Entkeimung größerer Wassermengen.

Heute gebraucht man diese Technik zur Herstellung steriler Lösungen in der Pharmazie und in der Getränkeindustrie.

In der Bakteriologie wurden MF zunächst zur Herstellung bakterienfreier Kulturfiltrate benutzt. Durch Unregelmäßigkeiten in der Porenweite waren die MF aber oft bakteriendurchlässig. MEYERRINGH (4) beobachtete, daß Filter,

die das Durchwandern von Colibakterien verhindern sollen, eine Porenweite von höchstens $1,2 \mu$ haben dürfen. Er findet aber auch, daß die MF wegen der schnellen Durchflußgeschwindigkeit sich sehr gut zur Trinkwasserfiltration eignen. (2) Ebenso wie HOFFMANN benutzte er die Membranfiltration, um Wasser zu entkeimen.

Was die Bakterien-Durchlässigkeit der MF angeht, so erwähnt KRUSE (4), daß bei einer Bakteriendichte von 5000 pro cm^2 die Filter nicht mehr bakterienundurchlässig sind.

Später fand das MF auch in der bakteriologischen Diagnostik Anwendung, als man sich mehr für den Filtrationsrückstand zu interessieren begann. SCHMIDT (2) war der Ansicht, mit dem MF das Gewicht von Bakterien bestimmen zu können.

Intensiver befaßte man sich mit der bakteriologischen Diagnostik, als man gelernt hatte, Keime unmittelbar auf der Membranoberfläche zu züchten. ESCHER (2) 1927 spülte noch den Filtrationsrückstand ab, nachdem er Milch durch ein MF filtriert hatte. Durch Weiterverarbeitung züchtete er säurefeste Stäbchen. Auch ZEETTI (2) arbeitete nach der gleichen Art wie ESCHER und filtrierte Wasser mit pathogenen Keimen, spülte ebenfalls den Filtrationsrückstand ab und spatelte ihn auf Endo-Nährböden aus.

Erst um 1933 brachte man den Filtrationsrückstand auf dem MF direkt mit der Nährflüssigkeit in Verbindung. Man wies Keime unmittelbar auf der Membranoberfläche nach. Diese Untersuchungstechnik wurde unter der Bezeichnung Membran-Filter-Methode (MFM) zu einem Verfahren weiter ausgearbeitet.

Eine bedeutende Anwendung findet diese Methode seitdem in der Wasser- und Abwasserbakteriologie zum Nachweis von *E. coli*. Das Prinzip der MFM besteht in der Anreicherung der Keime aus bakteriell verunreinigten Flüssigkeiten, speziell Wasser, auf einer vergleichweisen kleinen Filteroberfläche. Die Mikroorganismen werden auf der MF-

Oberfläche abgelagert und nicht innerhalb der Porenstruktur. Dort auf der MF-Oberfläche sind dann die Keime einer nachfolgenden Weiterbehandlung und Untersuchung zugänglich. Das MF mit den auf der Filteroberfläche angesammelten Keimen wird mit der Rückseite auf einen Nährboden gelegt. Infolge der Kapillarattraktivität können dann bei den sonst üblichen Inkubationsbedingungen Nähr- bzw. Farbstoffe von unten an die Membranoberfläche diffundieren. Die Keime wachsen auf der Filteroberfläche zu Kolonien heran. Der gleichmäßige feuchte Kontakt jeder abgelagerten Zelle mit dem Nährmedium führt zu einem fast einheitlich großen Kolonienwachstum und ist für jede Bakterienart gleichgroß. BARSOV (5) erarbeitete dieses Verfahren. Über die Anwendung dieser Methode im Moskauer Wasserwerk schreiben die Russinnen ROSSOWSKAJA und RACHLINA (2). Auch im Kiewer Wasserwerk ist dieses Verfahren gebräuchlich, wie FELDMANN 1942 (2) berichtet. Im zweiten Weltkrieg wird die MFM, da im Bombenkrieg viele unserer Laboratorien zerstört werden, wieder bekannter und in verstärktem Maße eingeführt.

II. Vorteile der Membran-Filter-Methode gegenüber den älteren Wasseruntersuchungsverfahren

Die MFM zum Nachweis von *E. coli* im Wasser kann heute den sonst üblichen Bakterienuntersuchungsverfahren gleichgesetzt werden; ja sie hat sogar gegenüber den anderen gebräuchlichen Methoden Vorteile. Um die MFM den heute üblichen Standard-Analysenverfahren zum Nachweis von Bakt. coli und anderer Keimgruppen fäcaler Verunreinigung in Wasser und Abwasser gleichzusetzen, müßten von dieser Methode folgende Eigenschaften gefordert werden:

1. Alle vorhandenen Keime fäcaler Verunreinigung müssen sicher in der zu untersuchenden Wassermenge erfaßt werden.
2. Die Ergebnisse sollen frühzeitig und sicher bekannt werden.
3. Auch größere Wassermengen müssen in einem Arbeitsvorgang untersucht werden können.
4. Das Verfahren muß wirtschaftlich und in der technischen Handhabung einfacher sein.
5. Im Vergleich zu den anderen Prinzipien müssen ebensolche, wenn nicht noch genauere und bessere Ergebnisse gefunden werden.

Ad 1:

Durch die MFM werden sämtliche Bakterien in der zu untersuchenden Flüssigkeitsmenge auf der MF-Oberfläche abgelagert und nicht innerhalb der Porenstruktur des MF; sie werden angesammelt und anschließend weiterbehandelt, d.h. in situ bebrütet, insgesamt oder teilweise ausgezählt (1). Außerdem lassen sich mit dieser Art der Untersuchung nicht nur Coli-Bakterien als Indikator fäcaler Verunreinigung bestimmen, es werden auch Typhus-, Paratyphus- und Ruhrerreger, sowie Tbc-Keime nachgewiesen. HEINEMANN (6), ROGERS (7) und PLOTHMANN (8) referieren im neueren Schrifttum über den Nachweis von Tbc-Bazillen. SERVY (9) berichtet über eine Typhuserkrankung in der Tschechoslowakei. SCHÜTZ und KRUSE (2) weisen den Vorteil des Verfahrens nach und stellen ihn den anderen Wasseruntersuchungsmethoden gegenüber.

Nach den älteren Verfahren wird die Anzahl der Colibakterien durch Plattenauszahlung, durch Erkennen von Gasbildung, H_2S -Entwicklung oder einer bestimmten Indikatorreaktion aerobes bzw. anaerobes Wachstum um Röhrentest bestimmt.

Ein weiterer Vorteil der MFM besteht noch darin, daß bei dem Vorgang der Ablagerung der Bakterien auf der Filteroberfläche die Bakterien von ihrer Umgebung, die z.T. wachstumshemmend sein kann, wie Bakteriophagen und Enzymen getrennt werden. Dies bedeutet, daß ein wachstumshemmender Faktor nicht mehr gegenwärtig ist und die Entwicklung zur Kolonienform ungehindert erfolgen kann.

ad 2:

Mit den bisher üblichen Verfahren war frühestens mit einem Ergebnis innerhalb von 72 Stunden zu rechnen. Die MFM verkürzt diese Zeit auf 12- 24 Stunden. Es kann schon nach 4 Stunden ein Wachstum beobachtet werden (1).

ad 3:

Auch größere Wassermengen können mit Hilfe der MFM untersucht werden. Die Plattenausählung begrenzt im allgemeinen die zu untersuchende Flüssigkeitsmenge auf 1- 2 cm³. Im Röhrentest können Wassermengen von 10- 100 cm³ untersucht werden. Die MFM gestattet weit größere Flüssigkeitsmengen zu filtrieren. Auch solche Mengen mit einer außerordentlich geringen Bakterienzahl pro Liter Wasser sind der Methode zugänglich; dies ist sogar von wesentlicher Bedeutung, denn die geringste Anzahl der Bakterien wird auf der MF-Oberfläche konzentriert und gelangt dort zur Weiterentwicklung. Dieser Vorteil der Untersuchungsmethode kommt gerade bei keimarmen Wässern, z.B. zur Kontrolluntersuchung großer zentraler Wasserversorgungsanlagen richtig zur Geltung (BROSCHT und ZIMMERMANN (10)).

ad 4:

Außer einer Einsparung an Zeit, wie unter 2) angegeben, führt die MFM auch zur Ersparnis an Material, Glaswaren, Nährböden, wie amerikanische Forscher (GOETZ, TSUNEISHI (1) und GOETZ, GILMAN und RAWN (11)) berichten. Diese amerikanischen Autoren waren es auch, die angeregt durch die bisherigen Ergebnisse, nach 1947 an Verbesserungen

in bezug auf Filter, besserer und rascherer Erkennung des Bakterienwachstums und der Kolonienbildung arbeiteten. Sie variierten weiterhin Nährböden, entwickelten spezielle Nährmedien, die fast nur das Wachstum von Coli-Bakterien erlauben. So brachten sie, anstatt die üblichen Agar-Nährböden zu verwenden, auf Kartonagescheiben bestimmte Nährflüssigkeiten und legten das mit Bakterien beladene MF mit der Rückseite auf die Kartons zur weiteren Entwicklung. Auf dieser Basis beruht jetzt die Anwendung der MFM. Ebenso ist die Technik dieser Untersuchungsmethode sehr vereinfacht worden, die in einem der nächsten Abschnitte behandelt wird.

Der wesentliche Punkt der fünf genannten ist folgender:

ad 5:

Er verlangt, daß die MFM den klassischen Wasseruntersuchungstesten entspricht, bzw. daß bessere und eindeutigere Ergebnisse erhalten werden. Vergleichsuntersuchungsergebnisse zwischen der MFM und den klassischen Untersuchungstesten liegen vor.

KARAKASEVIC (3) vergleicht 457 Wasserproben mit der MFM und der sog. "Wahrscheinlichkeitsprobe" (Presumptivetest). Die Resultate bei der letztgenannten Probe hängen nicht nur von der Anzahl der in den Verdünnungen zufällig suspendierten Coli-Bakterien ab. Es ist deshalb verständlich, daß die Ergebnisse dieses Verfahrens mit Fehlern belastet sind. Außer diesen Faktoren sei aber auch noch vermerkt, daß z.B. Stoffe auftreten können - wie schon unter 1) beschrieben -, die das Wachstum der Bakterien auf dem künstlichen Nährboden negativ beeinflussen oder eine Gasentwicklung verhindern können, also die biochemischen und physiologischen Lebensverhältnisse der Bakterien verändern. Auch JANNASCH (12) erwähnt dies in seiner Arbeit; desgleichen ZOBELL (12), der berichtet, daß sehr kleine Partikel von einer Größe bis zu 1μ auf die Bakterienvermehrung nicht fördernd wirken, sondern sogar das Wachstum hemmen können.

Die Zahl der Coli-Keime versuchte man an anderer Stelle wurde darüber berichtet- durch direkte Auszählung auf verschiedenen festen Nährböden zu bestimmen. Man erzielte aber keine besseren Ergebnisse. Die Ursache liegt sicher nach Ansicht von KARAKASEVIC (3) darin, daß man keinen Nährboden fand, auf dem nur E. coli wuchs, der aber auch gleichzeitig eine deutliche und sichere Differenzierung zwischen den sonstigen noch im Wasser befindlichen Keimen und den Coli-Bakterien erlaubte.

KARAKASEVIC stellte folgende Untersuchung an: Er vergleicht erstens die wahrscheinliche Zahl ("most probable number" (LPN)) der Coli-Bakterien einer bestimmten Flüssigkeitsmenge in verschiedenen Nährböden (Laktosebouillon, Brillantgrün, Laktose-Galle, Mc Conkey-Nährboden und Laktosepeptonwasser mit Andrade-Indikator) des "presumptive Tests" mit der Zahl der Coli-Bakterien, die auf MF festgestellt werden konnten. Er fand, daß mit der MFM "weniger negative Ergebnisse" ermittelt wurden, d.h. es ließen sich eine weit größere Zahl von Wasserproben mit einem relativ höheren Bakterien Coli-Gehalt finden als bei dem MPN-Test. Weiter stellte er fest, daß die durchschnittliche Gesamtkeimzahl auf MF bei sämtlichen untersuchten Wasserproben wenig höher lag als die Anzahl der Keime, die auf Agar-Nährböden bei 37°C wuchsen. Er vergleicht außerdem zweitens die Gasbildung im Röhren-Test mit den oben angeführten Nährböden mit der MFM, wobei er bemerkte, daß bei der MFM eine geringe Zahl und ein geringerer Prozentsatz an "fälschlich-positiven" Resultaten erhalten wurde. Der Grund hierfür ist, daß im Wasser verschiedene aerobe und anaerobe Mikroorganismen vorhanden sind, die Laktose unter Gasentwicklung fermentieren. Auch können im Wasser Synergisten anwesend sein, die einzeln Laktose ohne Gasbildung spalten, im Zusammenwirken aber Laktose unter Gasruption fermentieren. Noch verschiedene andere außer den oben angeführten Faktoren können zu "fälschlich-positiven" Ergebnissen führen, die entweder im Nährboden selbst oder im zu prüfenden Was-

ser enthalten sind und in den Stoffwechsel der Colibakterien eingreifen. Abschließend kommt KARAKASEVIC zu dem Ergebnis, daß bei der MFM die Anzahl der "falsch-positiven" Resultate geringer ist. Man erhält also zahlenmäßig genauere Ergebnisse.

BELING und MAIER (5) vergleichen in ihrer Arbeit "Die Wasserversorgung und ihre Überwachung mit Hilfe der MFM" die Bestimmung der Keimzahl, die der Indikator der Verunreinigung des Wassers ist, mit der Plattenauszahl-Methode und der MFM. So erkennt man bei der Untersuchung von Wasserproben der Fulda an den beiden Beispielen Fulda-Oberlauf und Unterlauf den Unterschied in der Keimanzahl beider Verfahren. Bei der direkten MFM ist die Keimzahl ungefähr sechsmal größer als bei dem Plattenauszahlverfahren. Ist auch in dieser Arbeit die Anzahl der untersuchten Beispiele außerordentlich gering, so kann man doch daraus feststellen, daß die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung bei der MFM wesentlich höher liegen. Bei Wässern mit geringer Keimzahl ist diese Feststellung von ausschlaggebender Bedeutung. Dieser Ansicht entsprechen auch BROSCHEIT und ZIMMERMANN (10).

Eine weitere Abhandlung über "Vergleichende Untersuchung des Nachweises von E.coli in Trink- und Flußwasser" von EMMENEGGER (13) behandelt die Bestimmung des Colititers an Hand des Gärröhrchen-Testes nach EIJKMAN und BULIR und der MFM. EMMENEGGER fand, daß der Colititer der untersuchten Trinkwasserproben bei beiden Untersuchungsverfahren mit wenigen Ausnahmen in der gleichen Größenordnung lag. Der Colititer war aber bei Flußwasseruntersuchungen mit Hilfe der MFM höher als bei der gleichzeitig angestellten Gärprobe nach EIJKMAN. Aus diesen Untersuchungsergebnissen folgerte er, daß die MFM dem Gärröhrchen Test überlegen ist.

In einer Abhandlung über die MFM berichtet auch BERGAMINI (14) über günstige Ergebnisse bei Anwendung dieser Technik im Vergleich zur Methodik zur Berechnung der wahrscheinlichen Colizahl ("presumptive test"). Aus dem amerikanischen

und französischen Schrifttum liegen gleichfalls vergleichende Arbeiten über die Anwendung der MFM und der Coli-Keimzahlbestimmung vor.

KABLER (15) findet bei 1706 Untersuchungen 73 % übereinstimmende Ergebnisse. Ebenso sind nach den Überprüfungen von SLANETZ und BARTLEY (16) ausreichend gute Befunde zu den üblichen amerikanischen Standardmethoden für Wasseruntersuchungen gefunden worden. Die beiden Autoren geben eine Zahl von 97 % als übereinstimmende coliforme Bakterien bei ihren Testungen an, davon wurden 58 % als *E.coli* identifiziert. OPPENHEIMER (17) berichtet, daß die MFM eine bessere Ausbeute zeigt als die sonstigen bisherigen Verfahren. BUTTIAUX (18) ist der gleichen Ansicht und sieht die MFM als sehr nützlich bei der Keimbestimmung aus Wasser an. Von ihm durchgeführte Vergleichsuntersuchungen mit anderen Verfahren ergaben gleiche Ergebnisse. SHIPE und CAMERON (19) sind der Meinung, daß die Unterschiede bei ihren gefundenen Ergebnissen, sie variierten die Zahl der Coli-Bakterien und impften diese in drei verschiedene Wassertypen ein, beim Vergleich der MFM und des Plattenauszahlverfahrens für die Wasser- und Abwasserprüfung möglicherweise auf Stoffen beruht, die toxisch auf das Wachstum der Colibakterien wirken. An anderer Stelle ist darüber auch schon mehrmals referiert worden. Die Zellzahlen hatten keinen Einfluß auf den Erfolg der angewandten Verfahren.

Es kann also, wenn man die aufgeführten Veröffentlichungen berücksichtigt, festgestellt werden, daß die MFM den anderen gebräuchlichen klassischen Standarduntersuchungsverfahren gleichgestellt werden kann.

Ein weiterer Vorteil der MFM gegenüber den anderen Testen ist noch der, daß die benutzten und getrockneten MF als Belege mit einer Klarsicht-Folie überklebt, fast ohne Veränderung aufgehoben werden können (1).

III. Chemische und physikalische Eigenschaften der Membranfilter

Die chemische Natur der Filter, die in der deutschen und amerikanischen Literatur unter der Bezeichnung Membranfilter (MF) (KRUSE (2), CLARK, GELDREICH, KABLER und JETTER (20)) bekannt sind, aber auch den Namen Molekularfilter tragen (GOETZ-TSUNEISHI (1)) wegen ihrer gewissen Struktur, besteht aus Zelluloseestern bzw. aus Zellulose-Regeneraten. Diese Filter bilden mit ihrer Gerüstsubstanz ein vielschichtiges Hohlraumsystem von hoher Porosität. Auf diesem feinen Porensystem beruht der Trennmechanismus. Die Wirkung entspricht der eines Siebes und nicht, wie bei Filtrationen mit Filtern fibröser Struktur, auf der Tiefenwirkung (GOETZ-TSUNEISHI (1)). Mikroskopisch ist die Struktur schaum-, schwammartig von gleichmäßiger Stärke und Oberfläche, und zwar, daß auf der einen Seite der Filterscheibe die Porengröße weiter ist als auf der Gegenseite ("anisomorphe Porenstruktur"). Die Seite mit den kleineren Porenöffnungen entsprechen der Oberseite des MF. Diese Verhältnisse also gestalten die Siebwirkung der MF, d.h. das Zurückhalten von kleinsten Partikeln auf der glatten MF-Oberfläche.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (HELMCKE (21)) an MF mit Hilfe der Metall-Schrägbedampfung der Oberfläche und Graphitierung der Rißkanten ergaben abgestufte, vielfältige Gangsysteme, die aus einzelnen zusammenfließenden Bläschen mit rundlichem Querschnitt zu entstehen scheinen.

Die jetzt im Handel erhältlichen amerikanischen Filter sind ungefähr 150 μ dick und besitzen eine Porosität von 75-85 %, GOETZ (22); Task Group Report (23). Die Durchflußgeschwindigkeit von destilliertem Wasser beträgt pro cm^2 Oberfläche bei einem Druck von 70 mm Hg bei 21°C

70- 80 cm³ pro Minute (Task Group Report (23)).

Die Porengröße kann durch Einhaltung von verschiedenen Temperaturen und Varilierung der Luftfeuchtigkeit während des Verdampfungsvorgangs des Lösungsmittels bei der Herstellung geändert und eingehalten werden. Durch dieses Verfahren lassen sich MF mit Porengrößen von 3 μ - 0,05 μ herstellen (KRUSE (2)). Eine vollkommen gleichmäßige Porenweite ist auch heute nicht zu erzielen. Die Filter stellen nicht ein regelmäßiges Sieb- oder Röhrensystem dar. Man bestimmt deshalb den "mittleren Porendurchmesser" in Stufenbereichen. Die Membranen zeigen nach Herstellungsart und -absicht verschiedene Durchgangswerte. Zur Bestimmung des "mittleren Porendurchmessers" bedient man sich verschiedener Verfahren.

HENNEBERG und CRODEL (24) geben verschiedene Faktoren an, die bei der Bestimmung des Porendurchmessers zu beachten sind. Die Messung ist abhängig von der Schichtdicke, dem Durchmesser des MF und der Differenz aus dem Trocken- und Naßgewicht. Diese Faktoren zusammen beeinflussen die Durchgängigkeit der Filter. Die von den beiden Autoren angegebene Methode bestimmt die Geschwindigkeit, mit der eine abgemessene Wassermenge unter einem gewissen Druck gegen eine Wassersäule durch die Filterscheibe gepreßt wird. Das schon Jahre zuvor beschriebene "Blasen-Druckverfahren" von BECHHOLD (2) preßt Luft von unten gegen ein mit einer Wassersäule überschichtetes MF. Der Druck der notwendig ist, um die ersten Luftblasen durch das MF zu drücken, ist meßbar. An Hand einer mathematischen Formel lassen sich die größten Poren bestimmen (KRUSE (2)). Auf diese Weise werden MF auf ihre bakteriologische Brauchbarkeit eingeordnet. Je größer die Porenweite ist, um so stärker weichen die Meßergebnisse der beiden Methoden voneinander ab. Wird die Porengröße aber kleiner, so stimmen die Werte folgerichtig überein. Es ist außerdem anzuraten, die Filteroberfläche zu bezeichnen und die Meßwerte nur für den angegebenen Durchlauf in bestimmter

Richtung anzugeben, da wegen der "anisomorphen Porenstruktur" verschiedene Werte des "mittleren Porendurchmessers" angenommen werden müssen. Bei den amerikanischen und neuen deutschen MF ist dies durch das eingeprägte Gitternetz gegeben. Die MF amerikanischen Ursprungs, z.B.: HA-Typ (GOETZ (2)) haben eine ungefähre Porenweite von $0,5 \mu$ und eine Porenanzahl von ca. 1×10^8 auf den cm^2 . Bei diesen 47 mm im Durchmesser großen, dünnen Filterscheiben mit glatter Oberfläche beträgt die Fläche für die tatsächliche Filterung $9,6 \text{ cm}^2$. Jedes aufgedruckte Quadrat stellt somit fast $1/100$ der zur Filterung gebrauchten Oberfläche dar.

GOETZ und TSUNEISHI (1) sehen noch einen weiteren Vorteil der MFM gegenüber der Plattenkultur darin, daß eine 30- 50 mal größere Spanne der Auszählmöglichkeit vorhanden ist. Mit den Standarduntersuchungsmethoden lassen sich höchstens 8 Kolonien pro cm^2 ohne Zusammenfließen identifizieren und auszählen bzw. 500 auf dem gesamten Feld einer Standard-Petrischale. Mit der MFM auf der anderen Seite können Kolonien mit einer Wachstumsdichte bis zu 50 pro cm^2 bestimmt werden bzw. 5000 der gesamten Fläche. Bei noch stärkerer Wachstumsdichte läßt sich durch Auszählen einiger Quadrate und anschließender Multiplikation mit 100, dividiert durch die Flüssigkeitsmenge in cm^3 leicht ein Durchschnittswert bestimmen. (25) Das deutsche MF "Coli 5" hat diese Einteilung der Quadrate nicht.

CLARK und Mitarbeiter (26) verglichen amerikanische und deutsche Filter. Bei der Anwendung des deutschen Filters ist eine vorhergehende Sterilisierung in kochendem Wasser erforderlich. Nach der Sterilisation soll die Durchfließgeschwindigkeit vergrößert sein gegenüber MF amerikanischer Herkunft. Die amerikanischen Filter sind jetzt unter den Handelsbezeichnungen "Millipore", "Bac.-T-Flex Filter" (SLANETZ) und steril verpackt mit oder ohne vorangefertigtem Nährboden unter dem Namen "Isopor" erhältlich (Task Group Report). Beim Vergleich amerikanischer Typen werden

höhere Wachstumszahlen auf den "Bac.-T-Flex Filtern" als auf den "Millipore-Filtern" gefunden. Auch waren sie biegsamer und dauerhafter (SLANETZ (27)). Die "Isopor"-Filter sind in Polyäthylenbeuteln zu je 2 oder 6 Stück verpackt. Sterilisiert werden sie durch Äthylenoxyd-Gas, das den Polyäthylenbeutel durchdringt (GOETZ-TSUNEISHI). Durch Durchblasen mit steriler Luft wird anschließend das Äthylenoxyd entfernt.

Von sämtlichen Filtern wird gefordert, daß sie frei sind von chemischen Stoffen, die evtl. einen gegenteiligen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien ausüben können.

TAYLOR und BURMAN (28) stellten Versuche mit *Ch. prodigiosum* an MF an. Sterile Filtrate wurden auch unter sorgfältigsten Bedingungen bei amerikanischen Filtern niemals erhalten. Bei Untersuchungen an deutschen MF wurden meist sterile Filtrate mit diesem Test-Bakterium gefunden.

Die amerikanischen MF sind gegenüber den deutschen, speziell "Coli-5"-Filtern sehr spröde und brechen leicht. Diese Tatsache läßt eine Sterilisation im Autoclaven nur unter einem Druck von 10 lb. pro cm^2 für 10 Minuten zu, da sonst die Brüchigkeit zunimmt. "Coli-5"-Filter lassen sich bei einem Druck von 15 lb. pro cm^2 für 20 Minuten, ohne die charakteristischen Merkmale zu verlieren, autoclavieren.

Ein stärkerer Filtrationsdruck soll nach TAYLOR und BURMAN bei deutschen Filtern das Kolonienwachstum vermindern. Bei amerikanischen Filtern hatte ein erhöhter Filtrationsdruck keinen Einfluß auf die Ausbildung der Bakterienkolonien. Vorversuche mit neuen britischen MF, die von den beiden Autoren angestellt wurden, ergaben ausreichende Ergebnisse im Vergleich mit dem "presumptive Test".

Seit einiger Zeit sind außer dem "Coli-5"-Filter weitere neuere deutsche MF entwickelt worden. Diese ähneln den

amerikanischen "Isopor"-Filtern; nur ist die Quadrateinteilung des eingepprägten Gitternetzes etwas flächengrößer, das den "Coli-5"-Filtern nicht aufgedruckt ist. Auch sind die neuen deutschen MF nicht mehr so stark als das "Coli-5"-Filter. Die neuen deutschen MF werden, ebenso wie die amerikanischen "Isopor"-Filter, mit vorangefertigten Nährböden von den Sartoriuswerken, Göttingen, hergestellt, die auch das "Coli-5"-Filter einschließlich Filtergerät sowie Filter für andere Zwecke entwickelt haben.

IV. Nährböden- Nährkartonscheiben

Die vorgefertigten Nährböden werden jetzt dehydriert, steril mit MF zusammen verpackt geliefert. Bis zur Anwendung dieser Nährböden legte man die MF auf Endo-Agar-Nährböden mit einem pH von 7,6. So schreibt KRUSE (2), daß diese Agar-Nährböden nicht mehr als 1 % Agar enthalten sollen, um die Diffusion durch das MF zu verbessern. Die Nährböden sollen im Kühlschrank aufbewahrt werden, um vor Gebrauch nicht austrocknen zu können.

1947 empfiehlt MÜLLER (29) agarfreie von Fließpapier aufgesaugte Endo-Brühe (Milchzucker-Fuchsin-Papierplatte). GOETZ und TSUNEISHI (1) berichten in ihrer Monographie, daß als Träger der Nährflüssigkeit runde, den MF in der Größe entsprechende, dicke Kartonscheiben gebraucht werden. Diese Kartonscheibe (Nährscheibe) ist sorgfältig vorbehandelt und soll völlig frei sein von Substanzen, die das Wachstum der Bakterien im negativen Sinne beeinflussen. GOETZ und TSUNEISHI stellten diese Nährscheiben in einer solchen Stärke her, daß sie ca. $2,0 \text{ cm}^3$ Nährflüssigkeit aufsaugen können. So erhält ungefähr jeder cm^2 des MF

0,1 cm³ an Nährflüssigkeit. Diese Menge ist für eine gute Wachstumsdichte ausreichend.

CLARK, GELDREICH, JETTER und KABLER (20) bedienten sich mehrerer dieser Nährscheiben als Träger verschiedener Nährflüssigkeiten. Sie legten in der ersten Phase der Wachstumsbildung das mit Bakterien beladene MF für die ersten 2- 3 Stunden der Inkubationszeit auf einen allgemein stimulierenden Anreicherungs Nährboden, so z.B. Laktose-Dextrose-Pepton und wechselten dann unter sterilen Kautelen auf eine andere oder mehrere Kartonscheiben über. Diese waren mit einem selektiven, zum Teil wachstumshemmenden, Differentialnährmedium imprägniert.

Zur speziellen Coli-Unterscheidung von anderen Keimen benutzten CLARK und KABLER (30) 1952 in dieser 2-Stufen-Anwendung für 2- 3 Stunden zuerst eine Kartonscheibe, die mit einer stimulierenden Nährflüssigkeit getränkt war. Danach legten sie das MF auf Endo-Nährmedium (bas. Laktose-Fuchsin). Die Anwendungsweise ließ eine wesentlich höhere E. coli- und Aer. aerogenes-Entwicklung zu als die alleinige Verwendung eines Endonährbodens. Entfärbtes Fuchsin nämlich ist ein ausgezeichnete Nährboden, um Laktose spaltende und Laktose nicht fermentierende Bakterien zu unterscheiden. Im wesentlichen fördert es das Wachstum aller coli-ähnlichen Organismen wie E. coli und Aerobacter-Gruppen. Um aber wirklich gute Resultate zu erhalten, ist es angebracht, anhand biologischer Versuche den optimalen Sulfit-Gehalt zu bestimmen, das heißt die Konzentration zu variieren.

JANNASCH (12) benutzt zur Gesamtkeimzahlbestimmung einen Peptonnährboden, zum Coli-Test einen Laktose-Fuchsin-Sulfitnährboden, die beide vorher auf Kartonscheiben gebracht, getrocknet und sterilisiert wurden. Bei seinen bakteriologischen Untersuchungen in Afrika konnten Agar- oder Gelatineböden nur schlecht verwandt werden. Außerdem war das Sterilhalten der Kartonagennährböden wesentlich leichter.

GELBREICH und JETTER (11) sahen, daß Eosin-Methylenblau-(EMB) und Gallennährböden zusammen eine ausreichende Unterscheidung zwischen *E. coli* und *Aer. aerogenes* zulassen. Die gleiche Methode kann auch zur Differenzierung der *Salmonella*-Arten angewandt werden.

Dagegen erwähnen KABLER und CLARK (30), daß der EMB-Brühe eine Brauchbarkeit als Nährflüssigkeit abzusprechen sei, da das Eosin sehr schlecht durch das MF diffundiert. Laktose fermentierende Organismen lassen sich schlecht von Laktose nicht-spaltenden Bakterien bei Anwendung der EMB-Brühe differenzieren. Das gleiche liegt bei Verwendung der Desoxycholatcitratbrühe vor. Wichtig ist es aber, daß die Einzelbestandteile der Nährflüssigkeiten in Wasser völlig gelöst sein müssen.

Zugleich mit dem Wachstum der einzelnen Kolonien können dann die Gruppen und Arten an Hand der speziellen Form und Gestalt sowie ihrer charakteristischen Farbe in oder um die Kolonien identifiziert werden. So wachsen zum Beispiel *E. coli*, aber auch die anderen Laktose spaltenden Bakterien dunkel bis schwarz mit einem typisch metallischen Glanz. Laktose nicht spaltende Gruppen wachsen als farblose Kolonien auf rosa Membranen (KABLER-CLARK (30)). Wilson-Blair-Brühe (Wismuthsulfit) dient in ausgezeichneter Manier zur Isolation von *S. typhi*. Ein vorhergehendes Anreicherungsverfahren ist nicht wünschenswert, da sonst ein Wachstum der übrigen Organismen angeregt wird und nicht das der Salmonellen. *S. typhi* bildet konvexe, glänzende schwarze Kolonien, die von einem weißen Saum umgeben sind. *S. typhi-murium* ähnelt den *S. typhi*-Kolonien in Farbe und Schein, nur ist das Zentrum der Kolonien eingedellt. Ein bedeutend intensiveres Wachstum von *S. typhi-murium* erhält man, wenn eine Anreicherung für drei Stunden in Tetrathionatbrühe vorausgeht und anschließend für die folgenden 15 Stunden der Bebrütungszeit Brillant-Grün-Lösung hinzugefügt wird.

Brillant-Grün (modifiziert nach Kaufmann) hemmt zumindest das Wachstum von Typhus-Bakterien, *S. enteritidis*, sowie

anderer, jedoch nicht coliform gram-negativen Bakterien; umgekehrt wachsen Coli-Stämme recht gut (KABLER (31)1954).

KORS (32) erwähnt in seiner Schrift, daß nach einer 12-stündigen Bebrütung bei 42° auf einem Anreicherungsboden und anschließendem Überwechseln auf einen Differenzierungsnährboden, der Rozolsäure enthält, ohne weitere Identifikation sich Darmkeime gut nachweisen lassen.

Weitere Nährmedien, sei es zur Gesamtkeimzahlbestimmung und Auszählung, sei es zur Identifizierung der coliformen Keime, geben GOETZ und TSUNETSHI (1) an. Auch im Task Group Report (23) sowie in einer Veröffentlichung der amerikanischen Water-Works Assoziation (33) sind brauchbare Rezepte für Nährlösungen aufgezeichnet.

GOETZ, GILMAN und RAWN (11) sahen aber in dieser 2-Stufenentwicklungsmethode den Nachteil, daß beim Wechsel von der einen zur anderen Nährscheibe das Wachstum der Kolonien beeinträchtigt werden kann. Aus diesem Grunde bemühten sich GOETZ, GILMAN und RAWN, diese Entwicklungsmethode in einen Arbeitsgang zusammenzulegen. Sie entwickelten eine mit Nährflüssigkeiten vorher imprägnierte, aber wieder dehydrierte Kartonscheibe, die aus zwei Komponenten besteht. Die Bestandteile sind ein dünnes Blatt Fließpapier A und eine dickere runde Scheibe Karton B. Das dünne Fließpapierblatt A ist mit einer bestimmten Menge einer allgemeinen oder nur teilweise stimulierenden Anreicherungsnährflüssigkeit imprägniert, während die Kartonscheibe B mit einer anderen Nährflüssigkeit oder einem wachstumshemmenden Medium getränkt ist. Beide Komponenten werden dehydriert und bilden zusammen eine Einheit. Erst kurz vor Gebrauch wird dann dieser aus 2 Komponenten bestehender Kartonnährboden mit 2,3 cm³ sterilem Aqua dest. angefeuchtet und anschließend das MF oben aufgelegt. Das Fließpapier A hat die Eigentümlichkeit, wahlweise den

wachstumshemmenden Stoff aus der Scheibe B zurückzuhalten, bis die Scheibe A gesättigt ist. Beim Einlegen der Nährkartonscheibe in die Petrischale, die die benötigte Wassermenge ($2,3 \text{ m}^2$) enthält, um die Kartonscheibe anzufeuchten, wird zuerst die Kartonscheibe B durchfeuchtet. Dann dringt der Nährstoff von der Scheibe B in das Fließpapier A. Darauf erst dringen die Nährstoffkomponenten infolge der Kapillarattraktivität durch das MF an die Oberfläche des Filters. Wenn die Nährlösung der Scheibe B das Filterblatt A durchdringt, wird die Farbe in der Lösung durch A entfernt, da diese infolge Addition des gelösten Nährmediums in A angereichert wird. Da das Mischungsverhältnis von A-B auf der MF-Oberfläche veränderlich ist, wird meist mehr Nährmedium der Scheibe B hindurchwandern; es wird allmählich eine größere Farbkonzentration auf dem MF hervorgerufen und zwar in dem Maße als A gesättigt ist.

Zum Schluß wird die Nährlösung der Kartonscheibe B in ihrer ursprünglichen Konzentration das Filterpapier A durchdringen. Dadurch werden die Mikroorganismen auf der MF-Oberfläche im Beginn der Wachstumsphase von einem Anreicherungs Nährboden erreicht, der nur allmählich seine Konzentration verändert.

Im Gebrauch weisen diese vorgefertigten und dehydrierten Nährkartonscheiben zwei wesentliche Vorteile auf;

1. Die Laboratorien, die bakteriologische Untersuchungen anstellen müssen, brauchen keine Nährböden herzustellen.
2. Die in ihrer Zusammensetzung immer gleichbleibenden Nährbodenverhältnisse gewährleisten eine gleichmäßige Diffusionsgeschwindigkeit und Kolonieentwicklung während der vorgeschriebenen Bebrütungstemperatur und Zeit.

Diese Nährkartonscheiben sind in den USA u.a. unter dem Handelsnamen "Isopor" der AG-Chemical Company, Pasadena,

erhältlich. Sie werden mit oder ohne MF, steril verpackt, geliefert. Nach diesem amerikanischen Vorbild stellen die Sartorius-Werke, Göttingen, gleichfalls MF mit vorgefertigten, dehydrierten Nährkartonscheiben in sterilen Pakungen zu je 6 Stück her. Die amerikanische Firma hat bis jetzt verschiedene Nährkartonscheiben entwickelt.

Uns interessieren hier im wesentlichen "Endo"-, "EMB"- und "Bi-sulfit"-Nährkartonscheiben. Die Sartorius-Werke, Göttingen, liefern vorerst nur Nährkartonscheiben vom "Typ-Endo". Einzelheiten über diesen Typ deutscher Fabrikation sind zur Zeit nicht bekannt. Dagegen liegen Beschreibungen über die verschiedenen Typen amerikanischer Herkunft vor (34).

Nährkartonscheiben vom "Typ-Endo" dienen dem raschen, speziellen Erkennen von *E. coli* und *Aer. aerogenes*. Sie liefern ähnliche, aber eindeutigere und selektive Ergebnisse als der sonst zu diesem Zweck gebräuchliche Fuchsin-sulfit-nähragar. Die Nährkartonscheibe besteht aus zwei Schichten: einer dicken purpurroten Kartonscheibe, die als Träger des Nährmediums (Pepton, Laktose und Fuchsin-Na-sulfit) dient. Die andere Schicht enthält in einem dünnen grünen Fließpapierblatt Brillantgrün in wasserlöslicher Form als Anreicherungsflüssigkeit bzw. als wachstumshemmender Stoff. Die beiden Bestandteile sind getrennt, um eine gegenseitige Beeinflussung während der Lagerung zu vermeiden, und um außerdem während der Inkubationszeit den Kontakt der Organismen auf der MF-Oberfläche mit Brillantgrün vor dem Kontakt mit Fuchsin sicher zu stellen.

Die non-coli-ähnlichen Bakterien werden gleich im Wachstum gehemmt. Die Coli-Arten erhalten einen charakteristischen goldgelben Metallglanz im allgemeinen schon nach 10-stündiger Inkubationszeit. Die günstigste Bebrütungstemperatur liegt bei 37°C. EYE u.a. (35) sehen bei einer Temperatur von 32°C eine noch günstigere Entwicklung der Coli-Bakterien. Ein bestimmter Feuchtigkeitsgehalt der Luft ist außerdem unbedingt notwendig und wird von den genannten

Autoren um 35 % angegeben. Innerhalb von 16- 18 Stunden der Inkubationszeit erhält man die besten Ergebnisse. Eine länger dauernde Inkubationszeit kann das Zusammenfließen einzelner Bakterienkolonien begünstigen und so das Ergebnis verwischen; ungenaue Werte werden bei der Auszählung die Folge sein. Einen anscheinend gleichen Aufbau weist auch die Nährkartonscheibe des "Types-Endo" deutscher Herkunft auf. Außer diesem beschriebenen Typ werden auch Nährkartonscheiben vom "Typ-Endo" ohne Brillantgrün-Zusatz fabriziert.

Zur Unterscheidung zwischen E. coli und Aer. aerogenes wurden "EMB"-Nährkartonscheiben entwickelt, da beide gleich schnell und selektiv wachsen. Auch dieser Typ der Nährkartonscheibe besteht aus zwei Bestandteilen: in einer rötlichen Kartonscheibe ist Eosin und Methylenblau enthalten, außerdem ist in einem dünnen blauen Fließpapier Methylenblau als Anreicherungsmedium aufgespreichert. Versuche haben gezeigt, daß folgende Tatsache der Grund ist, um eine möglichst gute Entwicklung der Coli-Bakterien zu erhalten. Der Kontakt mit Eosin soll bis zu dem Zeitpunkt hinausgeschoben werden, bis die schnellste Wachstumsphase erreicht wird. Der Kontakt mit Methylenblau dagegen soll an einem wesentlich früheren Zeitpunkt beginnen. Deshalb ist eine genau dosierte Methylenblau-Menge in dem Fließpapier enthalten, Eosin-Gemisch dagegen in der dicken Kartonscheibe. Auf diese Art kommen die Coli-Bakterien wesentlich früher mit dem Methylenblau in Berührung. Gehemmt werden vor allem die nicht-coliähnlichen Bakterien, während E. coli mit grünlicher Tönung zu Kolonien heranwachsen. Aer. aerogenes-Kolonien sind an ihrem orangefarbenen Wachstum nach einer Inkubationszeit von 18- 24 Stunden bei Temperaturen um 37°C zu differenzieren. Im getrockneten, konservierten Zustand werden sämtliche Kolonien dunkelrötlich. Sollte die Membran wieder angefeuchtet werden, so können teilweise die früheren Originalfarben wieder auftreten.

Salmonellen wachsen,-wie schon in einem vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde - gut auf einer modifizierten Wilson-Blair-Brühe. Diese enthält vor allem Bi.-sulfit. Dieses Salz ist in der dicken weißen Kartonscheibe vorhanden. Außer dieser Substanz wird als zweiter Bestandteil der "Bi.-sulfit"-Nährkartonscheibe in einem dünnen Fließpapier Brillantgrün als wachstumshemmender Faktor in wasserlöslicher Form gespeichert. Brillantgrün soll das Wachstum von Bakterien der Coli-Reihe sowie anderer im Wasser vorkommender Bakterien unterdrücken.

Von außerordentlicher Bedeutung ist es aber, die charakteristische Reaktion - einen schwarzen Hof von reduziertem Wismut - zu erkennen. Bei etwas längerer Bebrütung erscheinen die Salmonellenkolonien mit einem silbernen Metallglanz. Noch ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist von Wichtigkeit. Auf der Rückseite der MF entstehen scharze Flächen. Treten diese Veränderungen schon nach 17 Stunden auf, so können Paratyphus B-Kolonien hiermit differenziert werden. Bei Typhus-Keimen tritt das gleiche Bild erst nach 22- 24 Stunden Inkubationszeit auf.

V. "Isopor-Water Laboratory"

Aus den bisherigen Ausführungen ist zu entnehmen, daß die MFM bei dem derzeitigen Stand ihrer Anwendung den üblichen klassischen bakteriologischen Untersuchungsmethoden gleichzusetzen ist. Die MFM ist in der letzten Zeit außerordentlich vereinfacht worden, und zwar insofern, daß von der oben genannten amerikanischen Firma unter Mitarbeit von A. GOETZ ein transportables Gerät entwickelt wurde, mit dem in einer einfachen Handhabung die Filtration von Wässern vorgenommen wird und dazu gleichzeitig die Bebrütung in Thermosflaschen durchgeführt werden kann.



Abb. 1

"Isopor-Water Laboratory"

(Erklärungen s. Seite 30)

Mit diesem Gerät wurden, um seine Brauchbarkeit zu prüfen, Vergleichsuntersuchungen zwischen amerikanischen Filtern der Handelsmarke "Isopor" und den neuen Filtern der Sartorius-Werke, Göttingen, durchgeführt. Als Wasserproben diente Nahewasser, das im Abschnitt der Nahe zwischen Bad Münster am Stein und Bad Kreuznach im sogenannten Salinental im Januar und April 1957 an verschiedenen Stellen entnommen wurde. Außerdem wurden Rheinwasseruntersuchungen zwischen Laubenheim oberhalb Mainz und Heidesheim (Rhh.) durchgeführt. Die Untersuchungen beziehen sich fast nur auf das rein zahlenmäßige Bakterienwachstum, speziell von *E. coli*.

Bevor aber auf diese Untersuchungen einzugehen ist, soll das Gerät "Isopor-Water Laboratory" beschrieben und seine Handhabung erläutert werden (36). (s. Abb. 1 S. 29).

Erklärungen:

- A) Behälter des Gerätes aus Fiberglas (Kunststoff) wasserdicht, bruchsticher, abschließbar.
- B) Vorrichtung zur Aufnahme der Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm. Die Petri-Schale nimmt die Nährkartonscheibe und die zur Rehydrierung abgemessene Wassermenge ($2,3 \text{ cm}^3$) auf. Glasdeckel zum Abdecken der sterilen Petri-Schale, um diese vor Verunreinigungen während des Gebrauchs zu schützen.
- C) Schere; zum Aufschneiden der MF- und Nährkarton-Päckchen.
- D) Klammer, um angebrochene Päckchen zusammenzuhalten.
- E) Pinzette mit flachen Branchen.
- F) Becher, 500 cm^2 Kapazität.
- G) Federklammer, mit darunter liegenden Reserve-Päckchen.
- H) Verbindungsschlauch zwischen eigentlichem Filtergerät und Unterdruckpumpe.
- I) Filterstand mit eigentlichem Filtergerät. Das Filtergerät besteht aus zwei Teilen: dem Bodestück, in das eine Vertiefung eingelassen ist. In dieser Vertiefung befindet sich eine Koksplatte (wegen ihres neutralen chemischen Verhaltens). Auf diese Koksplatte kommt beim

Filtrationsvorgang das MF zu liegen. Auf das Bodestück wird ein nicht rostender nach unten konisch zugehender Metallzylinder mit einem drehbaren Ring zum Drehverschluß aufgeschraubt. Die Innenwand des Zylinders ist für 50,0, 100,0, 250,0 und 500,0 Flüssigkeitsmenge markiert.

- J) Abflußrohr mit Klemme (zum Entleeren des Ansaugbehälters (N)).
- K) MF-Halter.
- L) Vorrichtung zum Sterilisieren. Metallring mit Vertiefung. In der Vertiefung poröse Koksplatte.
- M) Schreibgerät (Tintenschreiber).
- N) Ansaug-Behälter: 1 Ltr. Fassungsvermögen.
- O) Druckmesser; 0- 30 Hg/inch..
- P) Verbindungsschlauch zwischen Pumpe und Druckmesser.
- Q) Vacuum-Pumpe.
- R) Spiritusbrenner.
- S) 2 Thermosflaschen (mit Gestellen und Kunststoffbeuteln; Petri-Schalen finden darin Aufnahme während der Inkubation) dienen als Inkubationsgerät.
- T) Methanol-Behälter aus Polyäthylen - (100,0ml.Kapazität). Methanol wird zur Sterilisation des Filtergeräts gebraucht. $2\text{CH}_3\text{OH} + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{HCOH} + 2\text{H}_2\text{O}$. Die bei der Verbrennung von Methanol sich entwickelnden Formaldehyddämpfe reichen bei einer Anwendungszeit von 10' + 15' zur Sterilisation des Filtergerätes vollkommen aus.
- U) Federklammer mit darunter liegendem "Parafilm" (Plastikfolie) zum Verschluß und zur Abdichtung der Petri-Schalen).
- V) Thermometer.
- W) 2 Petri-Schalen Behälter aus nichtrostendem Stahl. Inhalt je 12 Petri-Schalen (6cm Durchmesser).
- X) Wasserflasche aus feuerfestem Glas mit automatischer Pipette für steriles Aqua dest. Die Wasserflasche faßt ca. 250,0 ml.

Beim Druck auf den Gummiballon der automatischen

Pipette entleeren sich 2,2 bis 2,3 cm³ steril. Wasser. Diese Menge ist gerade nötig, um die sterilen dehydrierten Nährkartonscheiben zu befeuchten.

Vor Inbetriebnahme des Filtergerätes sollen sämtliche Vorbereitungen abgeschlossen sein. Dazu gehört, daß die Petrischalen sterilisiert sind, im Notfall durch längeres Kochen in sterilem Wasser; Filter, Nährkartonscheiben und "Parafilms" (Adhäsionsfilm) sollen ausreichend vorhanden sein. Für eine genügende Menge sterilen Wassers, Spiritus und Methylalkohol ist Sorge zu tragen. Die Thermosflaschen werden vor Beginn der Filtration mit auf 40°C erwärmtem Wasser gefüllt und dicht verschlossen.

Die Sterilisation des Filtergerätes selbst ist schon besprochen worden; sie soll aber nochmals erwähnt werden. In die Vertiefung mit der Koksplatte des Sterilisationsblocks werden 1- 2 cm³ Methanol gebracht und angezündet. Der Zylinder wird dann umgekehrt in die Vertiefung gestellt und auf den Zylinder das Bodenstück gelegt. Ein 10'- 15' lang dauerndes Einwirken der Formoldämpfe reicht zur guten Keimtötung aus.

Anschließend verfährt man wie folgt:

1. Das Bodenstück wird mit dem Schlauch nach unten in den Filterstand gesetzt.
2. Ein MF mit steriler Pinzette (Durchziehen durch eine Flamme) aus dem Päckchen entnehmen und in die Vertiefung des Bodenstücks auf die Koksplatte legen.
3. Anschließend den Zylinder durch Rechtsdrehung des Ringes, bis merklicher Widerstand gefühlt wird, auf das Bodenstück aufschrauben.
4. Die gewünschte Wassermenge zur Filtration in das Filtergerät schütten.
5. Jetzt bereitet man die Nährkartonscheibe. In die sterile Petrischale pipettiert man mit der automatischen Pipette 2,3 cm³ steril. Aqua dest. Durch vorsichtiges Einlegen - so daß keine Luftblasen unter

der Nährkartonscheibe auftreten - bringt man diese in die mit Wasser gefüllte Petrischale. Dabei ist auf sorgfältige Sterilität zu achten. Außerdem muß die Kartonscheibe mit dem dickeren Anteil nach unten liegen. Darauf ist die Petrischale abzudecken.

6. Aufgeschnittene MF-Nährkartonpäckchen sollen immer mit einer Klammer verschlossen werden.
7. Nun kann man mit der Filtration beginnen: man pumpt mit der Vacuumpumpe, bis das Manometer einen Unterdruck von 10- 12 Hg/inch anzeigt. Nachdem das ganze Wasser abgelaufen ist, Zylinder durch Linksdrehen des Ringes vom Bodestück trennen.
8. Mit einer sterilen Pinzette das MF von dem Bodestück wegnehmen und durch Abrollen, damit keine Luftblasen sich zwischen der Membran und der Nährkartonscheibe bilden können, auf den Nährboden in der Petrischale legen. Luftblasen verhindern nämlich, da sie den feuchten Kontakt zwischen MF und Nährmittel unterbrechen, das Wachstum der Bakterienkolonie.
9. Von einem Blatt des Adhäsionsfilms das Schutzpapier, ohne die Filmoberfläche zu berühren, entfernen. Diesen Film mit der Filmoberfläche über die Petrischale legen und unter leichtem Zug die überstehenden Ecken an die Schale andrücken. Es entsteht dadurch ein luftdichter Abschluß. Die Petrischale wird dann umgekehrt in das Gestell der Thermosflascheneingesetzt.
10. Die Hälfte des Wassers aus der Thermosflasche abgießen.
11. Petrischalengestell in den Kunststoffbeutel und diesen anschließend in die Thermosflasche stellen.
12. Nach den in dem vorigen Kapitel angegebenen Inkubationszeiten bebrüten.

Werden mehrere Testversuche ein und derselben Serie unternommen, so ist eine vorherige Sterilisation des Filtergeräts nicht unbedingt notwendig. Dagegen muß nach Untersuchungen verschiedener Test-Serien regelmäßig die Sterili-

sation des Filtergerätes nach oben angeführter Art durchgeführt werden. Mehrfache Temperaturkontrollen sind ebenfalls angebracht. Sollte die Temperatur des Wassers unter 32°C absinken, so muß das Wasser wieder etwas erwärmt werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Petrischalen aus der Thermosflasche entnommen. Die Kalorien auf dem MF werden sofort im frischen Zustand mit einer Lupe differenziert und ausgezählt; am günstigsten bei schräg einfallender Lichtquelle. Anschließend werden die MF auf Fließpapier getrocknet und können als Belege aufbewahrt werden.

VI. Vergleichsuntersuchungen von Bakterien-Reinkulturen,
sowie Rhein- und Nahewasserproben auf deutschen und
amerikanischen Membran-Filtern und Nährkartonscheiben

Über die physikalischen und technischen Eigenschaften der MF deutscher und amerikanischer Herkunft wurde ausführlich berichtet. Hier sei noch nachzutragen, daß MF deutscher Fabrikation im Durchschnitt größer sind als die amerikanischen. Sie entsprechen dem deutschen "Coli-5"-Filter.

Zunächst wurde das Bakterienwachstum auf beiden Filtern geprüft, um festzustellen, ob wachstumsmäßige Unterschiede bestehen. Diese Untersuchungen wurden mit dem im vorhergehenden Kapitel beschriebenen amerikanischen Filtergerät durchgeführt. Als Probeversuche filtrierten und bebrüteten wir Reinkulturen von *E. coli* und *Aerobacter aerogenes*, wie es auch EMENEGGER (13) in seinen Untersuchungen tat. Ferner wurden Erdbazillen in Bouillion angezüchtet, um das Wachstum der Sporenbildner auf den MF zu kontrollieren, weil ihre Differenzierung gegenüber *E. coli* Schwierigkeiten bereiten kann. Hierfür verwandten wir amerikani-

sche "Isopor" MF mit Nährkartonscheiben vom "Typ Endo" mit Brillantgrün (A+ BG), sowie deutsche MF mit "Endo"-Nährkartonscheiben ohne Brillantgrünzusatz (D- BG) und amerikanische MF auf Eosin-Methylenblau-Nährkartonscheiben (A+ EMB). Es wurde die Form und Farbe der Kolonien beobachtet und die Anzahl der gewachsenen Kolonien auf den einzelnen Filter miteinander verglichen. Auf den MF durch die Wasser mit Erdbazillenzusatz gefiltert wurde, war kein Wachstum zu erkennen. *E. coli* wuchsen dagegen bei Anwendung der Nährkartonscheiben vom "Typ Endo" auf deutschen und amerikanischen MF in gleicher Gestalt und Farbe, wie es früher ausführlich beschrieben worden ist. Auf EMB-Nährkartonscheiben waren *E. coli* als schwarze Kolonien zu erkennen, *Aerobacter aerogenes* dagegen bildeten schleimige Kolonien von schwarzem bis bräunlichem Kolorit. Weiterhin stellten wir Mischungen der genannten Reinkulturen her und filtrierte diese. *Aerobacter aerogenes* wachsen auf Nährkartonscheiben vom "Endo-Typ" als rötliche Kolonien mit Schleimbildung. Zahlenmäßig gibt die nachfolgende Tabelle I über das Wachstum der Bakterien eine Übersicht. (S. 36).

Ein anderer Testversuch auf deutschen und amerikanischen MF mit "Endo"-Nährkartonscheiben mit und ohne Brillantgrünzusatz zeigt die Tabelle II (S. 36). Sämtliche Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Ausgetestet wurden wiederum Colibakterien und *Aerobacter aerogenes*.

Erklärung der in den Tabellen angeführten Abkürzungen:

- A + BG : amerikan. Filter; Nährkartonscheibe "Endo" mit Brillantgrün
D - BG : deutsche Filter ; Nährkartonscheibe "Endo" ohne Brillantgrün
D + BG : deutsche Filter ; Nährkartonscheibe "Endo" mit Brillantgrün
A + EMB: amerikan. Filter; Eosin-Methylenblau-Nährkartonscheibe
"Coli-5": deutsches "Coli-5"; aufgelegt auf Mc-Conkey-Agar

	A + BG	D - BG	A + EMB
E. coli	11	64	13
Aer.aerogenes	210	206	180
E. coli + Aer.aerogenes	7 81 = 88	21 67 = 88	27 39 = 66
E. coli + *) Aer.aerogenes	19 200 = 219	19 208 = 227	86 118 = 204

*) 3-fache Menge des Bakteriengemisches

Tabelle I : Wachstum von Bakterienreinkulturen auf deutschen und amerikanischen Filtern und Nährkartonscheiben bei gleicher Keimeinsaat.

		D - BG	D + BG	A + BG
Bakt. coli	I	64	59	18
	II	56	69	17
Aer.aerog.	I	200	194	181
	II	171	189	198

Tabelle II : Wachstum von Bakterienreinkulturen auf amerikanischen und deutschen MF und Nährkartonscheiben bei gleicher Keimeinsaat.

Die Bebrütungstemperatur betrug in beiden Untersuchungen 37°C für 15½ Stunden.

Neben diesen Versuchsreihen ließen wir außerdem Reinkulturen von Salmonella enteritidis (Gärtner) sowie S.paratyphi B und Gemische beider unter den bekannten Bedingungen durch das MF laufen. Zur Verwendung kamen deutsche und amerikanische MF mit "Endo"-Nährkartonscheiben mit und

ohne Brillantgrün sowie ein amerikanischer Spezialfilter zum Nachweis von Salmonella typhi mit "Bismut-sulfit Nährkartonscheiben".

Auf "Endo"-Nährkartonscheiben, sei es deutschen oder amerikanischen Ursprungs, wachsen Paratyphus-B-Keime mit Schleimbildung und S.enteritidis (Gärtner) farblos oder schwach rötlich auf grünen "Bismutsulfit-Nährkartonscheiben" bräunlich. Eine sichere Differenzierung läßt sich nicht vollständig erreichen. Wir prüften deshalb im Agglutinationstest die Kolonien mit Hilfe der "diagnostischen Faktoren-Sera" der Behringswerke:

<u>Bacterium enteritidis</u> (Gärtner):	O-Antigene	IX Vi	+
	H-Antigene	gm	+
<u>Paratyphus B :</u>	O-Antigene	IV/V	+
	H-Antigene	b	+

Wie aus diesem Ergebnis zu ersehen ist, bleibt die Agglutinationsfähigkeit dieser Keime bei ihrem Wachstum auf Membranfiltern und Nährkartonscheiben erhalten und kann zur Beurteilung fraglicher Kolonien mit herangezogen werden.

Ein Gemisch von E. coli und Paratyphus B- Reinkulturen, sowie von Coli-Keimen und Bakt. enteritidis wurde ferner filtriert und auf "Endo"-Nährkartonscheiben und "Bismut-sulfit"-Nährkartonscheiben bebrütet. Auf "Endo"-Nährkartonscheiben ließ sich eine recht gute Differenzierung zwischen E. Coli und Bakt. enteritidis (Gärtner) erreichen. Auf "Bi-sulfit"-Nährböden wurde E. coli nicht nachgewiesen. (s. Tabelle III S. 38).

Beobachtet man an Hand der angestellten Probestestungen die Gesamtkeimzahl, so fällt auf, daß sie auf den Nährkartonscheiben deutscher Fabrikation im allgemeinen mit nur wenigen Ausnahmen höher liegt, als auf Nährkartonscheiben amerikanischer Provenienz. Weiterhin ist bemerkenswert,

	D - BG	D + BG	A + BG	Bi-sulfi+
E. coli	1028	894	114	-
Bakt. enter.	480	420	280	65
Paratyphus B	660	950	450	32
E. coli + Bakt. enter.	973 385=1358	*)	225 124=349	- -
E. coli + Paratyphus B	302 19=321	280 24=304	39 20= 59	- 28

*) Kolonien sind zusammengefloßen

Tabelle III : Vergleiche von Kolonienwachstum auf amerikanischen und deutschen MF und "Endo"-Nährkartonscheiben mit und ohne Brillantgrün, sowie auf "Bisulfit"-Nährkartonscheiben bei gleicher Keimeinsaat.

daß das beigegefügte Brillantgrün wachstumshemmend - wie schon beschrieben - auch auf Coli-Keime wirkt. Wie aus Tabelle III ersichtlich ist dies bei den amerikanischen Nährkartonscheiben noch wesentlich stärker ausgeprägt. Enteritis- und Paratyphuskeime zeigen diesen Abfall in der Keimzahl nicht. Noch ungünstiger wirkt sich diese Erscheinung bei den "Bi-sulfit"-Nährkartonscheiben aus. Hier betrug gegenüber den anderen Nährböden bei gleicher Keimaussaat die Kolonienzahl etwa 1/5 bis 1/10.

Auf diesen Testungen aufbauend untersuchten wir 8 Wasserproben des Rheines, die anfangs Oktober 1956 an verschiedenen Stellen auf der linken Uferseite zwischen Laubenheim oberhalb Mainz und Heidesheim/Rhh. entnommen wurden. Dabei stellten wir die Gesamtkeimzahl mit der Plattenauszahl-Methode (Nährbouillon-Pepton-Agar) fest und differenzierten im Parallelversuch mit Hilfe der MFM den Anteil an E. coli. Entnahmestellen waren:

1. Laubenheim,
2. Mainz, Eisenbahn-Südbrücke (Mainzer Ruderverein),
3. Mainz, 100 m unterhalb Winterhafen,
4. Mainz, Kaisertor,

5. Mainz, Ingelheimer Aue (Elektrizitätswerk),
6. oberhalb Budenheim,
7. Budenheim, hinter der chemischen Fabrik,
8. Heidesheim/Rhh., Heidefahrt.

Auch hier ist das Bakterienwachstum auf MF und Nährkartonscheiben deutscher Herkunft mit zwei Ausnahmen wesentlich höher als auf MF und Nährkartonscheiben amerikanischen Ursprungs, wie Tabelle IV zeigt. Die Gesamtkeimzahl und die Anzahl der E. coli-Kolonien beziehen sich auf 1 ml der untersuchten Wasserproben. Bebrütet wurde 20 Stunden bei 37°C.

Entnahmestellen	Gesamt-Keimzahl	A + BG	D + BG
1.	3350	287	476
2.	2650	59	125
3.	4950	550	520
4.	2750	130	560
5.	12500	50	250
6.	10000	160	620
7.	850	150	383
8.	1050	58	131

Tabelle IV : Bestimmung der Gesamtkeimzahl und des Wachstums von E. coli auf amerikanischen und deutschen MF und Nährböden je ml Rheinwasser.

Um weiterhin die Eignung der MF für Wasseruntersuchungen naturgegebener Verhältnisse zu prüfen und weitere Vergleiche zwischen deutschen und amerikanischen MF sowie Nährkartonscheiben ziehen zu können, wurden bakteriologische und biologische Wasseruntersuchungen der Nahe sowie der Triebwerksgräben von Bad Münster am Stein bis Bad Kreuznach vorgenommen. Da erhebliche bakteriologische Unterschiede zwischen

kälteren und wärmeren Jahreszeiten sowie bei Schwankungen des Wasserstandes bestehen können, wurden die Untersuchungen 2 mal durchgeführt, um einen Überblick über die Beschaffenheit und Selbstreinigungskraft sowie Keimzahlverhältnisse des Wassers zu erhalten. So wurden im Januar und April 1957 an folgenden Stellen zwischen Bad Münster am Stein und Bad Kreuznach Wasserproben entnommen:

1. Bad Münster am Stein: linkes Naheufer-Huttental,
2. Bad Münster am Stein: Uferschlamm (wie unter 1),
3. Bad Münster am Stein: rechtes Naheufer-Huttental,
4. Bad Münster am Stein: linkes Naheufer(Höhe Café Lorenz),
5. Bad Münster am Stein: 50 m unterhalb der Eisenbahnbrücke (linkes Ufer, nach Abwasser-Zufluß),
6. Bad Münster am Stein: Triebwerksgraben(nach Zufluß von Abwasser),
7. Bad Kreuznach : Triebwerksgraben (Höhe Gaststätte "Salinental"),
8. Bad Kreuznach : Triebwerksuntergraben (in Höhe eines geplanten Freibades),
9. Bad Kreuznach : linkes Naheufer, in Höhe des Schwimmbades,
10. Außerdem wurde eine Wasserprobe des Ellerbaches kurz vor seiner Einmündung in die Nahe untersucht. Der Ellerbach führt in verstärktem Maße Abwasser. Von besonderem Interesse war der eventuelle Nachweis von Milzbrandbazillen, da dieser Bach Abwasser von Gerbereien aufnimmt.

Von diesen Wasserproben wurden 1 ml mit 50 cm³ sterilem Aqua dest. verdünnt und filtriert. Bei 37°C wurden die Proben 15½ Stunden lang bebrütet. Die Gesamtkeimzahl bestimmten wir mit der Plattenzählmethode. Für den E. coli-Nachweis wurden bei den Proben, die im Januar entnommen wurden, Vergleichsuntersuchungen zwischen MF und Nährkartonscheiben deutscher und amerikanischer Herkunft durchgeführt.

In Tabelle V sind die Ergebnisse der Gesamtkeimzahl und die Zahlen der Coli-Bakterien, die bei der Verwendung von deutschen und amerikanischen MF und Nährkartonscheiben vom "Typ-Endo" erhalten wurden, für die einzelnen Proben wiedergegeben.

Entnahme- stellen	Gesamt- keimzahl	A + BG	D - BG	D + BG
1.	1240	45	228	197
2.	2270	-	-	-
3.	1180	80	246	173
4.	-	182	303	268
5.	18300	479	1104	722
6.	7000	1124	1684	1522
7.	2680	517	1149	997
8.	1720	43	231	138
9.	1020	136	215	222
10.	20600	649	1025	913

Tabelle V : Gesamtkeimzahlbestimmung, Wachstum von E. coli auf deutschen und amerikanischen MF und Nährkartonscheiben vom "Typ-Endo" mit und ohne Brillantgrün je ml Nahewasser.

Wegen der hohen Keimzahl, die bei den Wasserproben 5, 6, 7, 9 und 10 erhalten wurden, setzten wir Kontrollbestimmungen an. Wir stellten eine Verdünnung von 0,1 ml Nahewasser mit 50 cm³ sterilem Aqua dest. her und fanden folgende Werte:

Entnahme- stellen	Gesamt- keimzahl	A + BG	D - BG	D + BG	"Coli-5"
5.	18300	7	13	22	16
6.	7000	46	100	103	197
7.	2680	4	13	6	15
9.	1020	1	1	2	4
10.	20600	28	93	94	87

Tabelle VI : Nahewasser: Kontrollbestimmung in höherer Verdünnungsreihe wie Tabelle V.

Vergleichen wir die Ergebnisse miteinander, so liegt die Keimzahl auf deutschen MF und "Endo"-Nährkartonscheiben mit Brillantgrünzusatz immer höher als bei amerikanischen MF und Nährkartonscheiben vom "Typ-Endo" mit Brillantgrün. Während die Ergebnisse zwischen deutschen MF und "Endo"-Nährkartonscheiben mit und ohne Brillantgrün nicht wesentlich von einander abweichen.

Bei der Untersuchung im April 1957 wurden nur MF und "Endo"-Nährkartonscheiben ohne Brillantgrünzusatz deutscher Fabrikation gebraucht. Die Keimzahlen entsprachen im allgemeinen denen der ersten Untersuchung im Januar 1957, wenn man von den geringeren Abweichungen absieht, die durch den Zufluß wechselnder Abwassermengen bedingt sind:

Entnahmestellen	Januar 1957		April 1957	
	Gesamtkeimzahl	E.coli	Gesamtkeimzahl	E. coli
1	1240	228	900	80
5	18300	1104	21000	1280
6	7000	1684	3100	890
7	2680	1149	2500	1310
8	1720	231	2100	550
9	1020	215	1100	110
10	20600	1025	94800	4360

Tabelle VII: Nahewasser: Vergleichuntersuchung von Wasserproben im Januar und April 1957. Gesamtkeimzahlbestimmung und Wachstum von E. coli auf deutschen MF und Nährkartonscheiben vom "Typ Endo" ohne Brillantgrünzusatz.

Die Abnahme der hohen Keimzahl und des hohen Bakterien-coli-Gehaltes der Nahe in Bad Münster am Stein unterhalb der Eisenbahnbrücke bis Bad Kreuznach bis zur letzten Entnahmestelle (Bad Kreuznach in Höhe des Schwimmbades) zu verschiedenen Jahreszeiten, spricht für eine ausreichende Reinigungskraft des Nahewassers, die aber letztlich allein

von der biologischen Zusammensetzung des Wassers abhängig ist. Deshalb wurde zur Überprüfung dieser Annahme zusätzlich eine biologische Untersuchung vorgenommen, deren Ergebnis hier wiedergegeben sei, obwohl die Frage der Eignung der MFM hiervon direkt nicht betroffen wird.

Da aber die bakteriologischen Untersuchungen nur den jeweiligen von der Art und Menge der Belastung abhängigen Zustand des Wassers im Augenblick der Entnahme angeben, ist für die Gesamtbeurteilung des Wassers die biologische Untersuchung wesentlich wichtiger. Sie allein kann über die Funktionstüchtigkeit des Wassers auf weitere Sicht und seine Abwehrlage gegenüber Abwasserzuflüssen etwas aussagen.

Für die biologischen Untersuchungen wurde von jeder der im Januar 1957 entnommenen Proben 100 ml zentrifugiert und der Bodensatz mikroskopisch ausgewertet. Die Einteilung der bei der biologischen Beurteilung gefundenen Mikroorganismen erfolgte mit Hilfe der revidierten Fassung des Saprobien-systems von LIEBMANN (37).

Folgende Untersuchungsbefunde ergaben sich bei den verschiedenen Proben (die Numerierung erfolgt nach den oben angeführten Entnahmestellen):

1. Linkes Ufer der Nahe im Huttental, Bad Münster am Stein

Grünanlagen	:	Microspora amoena
Blaualg	:	Phormidium
Jochalgen	:	Spirogyra
Kieselalgen	:	Cymbella, Nitzschia, Pinularia, Tabellaria, Navicula, Gomphonema, Synedra
Sonnentierchen	:	Actinosphaerium
Geißeltierchen	:	Uroglene, Bodo globosus
Wimpertierchen	:	Halteria, Coleps, Dileptus, Paramecium

2. Bad Münster am Stein: Uferschlamm (wie unter 1)

Grünanlagen	:	Ulothrix zonata
Blaualg	:	Oscillatoria
Jochalgen	:	Closterium
Kieselalgen	:	Navicula, Pinularia, Cymbella, Nitzschia, Tabellaria, Hantzschia, Cyclotella, Synedra, Fragilaria

Sonnentierchen	:	Actinosphaerium
Geißeltierchen	:	Bodo globosus, Uroglena, Euglena viridis, Astasia
Wimpertierchen	:	Uronema und Spirillen

3. Rechtes Ufer der Nahe im Huttental, Bad Münster am Stein

Grünalgen	:	Ulothrix zonata, Enterophora, Scenedesmus
Blualgen	:	Microcystis
Jochalgen	:	Closterium
Kieselalgen	:	Cymbella, Tabellaria, Navicula, Gomphonema, Synedra
Sonnentierchen	:	Actinosphaerium
Geißeltierchen	:	Uroglena, Bodo globosus
Wimpertierchen:	:	Halteria, Dileptus, Paramaecium

5. Bad Münster am Stein, 50 m unterhalb Eisenbahnbrücke
(linkes Ufer, nach Abwasser-Zufluß)

Grünalgen	:	-
Blualgen	:	Oscillatoria
Jochalgen	:	Closterium
Kieselalgen	:	Cymbella, Nitzschia
Sonnentierchen	:	Actinosphaerium (reichlich)
Geißeltierchen	:	Bodo globosus, Astasia, Cryptomonas, Chilomonas, Chlamydomonas, Paranema
Wimpertierchen	:	Paramaecium caudatum, Uronema
Amoeben	:	Amoeba proteus (reichlich)

6. Triebwerksgraben Bad Münster am Stein, nach Abwasser-
zufluß

Grünalgen	:	Scenedesmus
Blualgen	:	Oscillatoria
Jochalgen	:	-
Kieselalgen	:	Navicula, Hantzschia, Diatoma, Tabellaria, Fragilaria
Sonnentierchen	:	Actinosphaerium (reichlich)
Geißeltierchen	:	Bodo globosus, Uroglena, Paranema (reichlich)
Wimpertierchen	:	Chilodonella, Uronema (reichlich)

7. Triebwerksgraben Bad Kreuznach, in Höhe der Gast-
stätte "Salinental"

Grünalgen	:	Scenedesmus
Blualgen	:	Oscillatoria
Jochalgen	:	-
Kieselalgen	:	Navicula, Hantzschia, Diatoma, Tabellaria
Sonnentierchen	:	Actinosphaerium (reichlich)
Geißeltierchen	:	Uroglena, Paranema
Wimpertierchen	:	Paramaecium, Chilodonella, Uronema
Amoeben	:	Amoeba proteus (reichlich)

8. Triebwerksuntergraben Bad Kreuznach, in Höhe eines geplanten Schwimmbades

Grünalgen	:	Microspora
Blaualgen	:	-
Jochalgen	:	-
Kieselalgen	:	Navicula, Cymbella, Gomphonema, Pinularia, Hantzschia, Cyclorella
Sonnentierchen	:	Actinosphaerium
Geißeltierchen	:	Uroglena
Wimpertierchen	:	Halteria, Paramecium, Pilzfäden

9. Die Nahe in Bad Kreuznach, Höhe des Freibades

Grünalgen	:	Scenedesmus
Blaualgen	:	Microcystis aeruginosa
Jochalgen	:	Closterium
Kieselalgen	:	Diatoma, Tabellaria, Navicula, Cymbella
Sonnentierchen	:	-
Geißeltierchen	:	Chlamydomonas, Astasia
Wimpertierchen	:	Halteria
Amoeben	:	Amoeba proteus und Pilzfäden

10. Ellerbach

Grünalgen	:	Nicht nachweisbar
Blaualgen	:	Nicht nachweisbar
Jochalgen	:	Nicht nachweisbar
Kieselalgen	:	vereinzelt Hantzschia
Geißeltierchen	:	Bodo globosus
Wimpertierchen	:	Colpidium colpoda, paramecium caudatum, Glaucoma, Urozoa
Pilze	:	Sphaerotilus natans
Bakterien	:	Zoogloea ramigera (Bäumchenbakterien), Spirillen; ferner Haare und reichlich Detritus

Die biologische Untersuchung der im April 1957 entnommenen Wasserproben zeigten außer geringen Abweichungen innerhalb der Verteilung der einzelnen Saprobier - was jedoch das Gesamtergebnis nicht verändert - keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den im Januar 1957 untersuchten Proben.

Auf Grund der Ergebnisse können die Wasserbefunde der Entnahmestellen 1-3, 8, 9 in die beta-mesosaprobe Stufe eingeordnet werden.

Bei den anderen Wasserproben handelt es sich wegen des ständigen Abwasserzuflusses um Organismen der alpha- bis beta-mesosaprobe Zone, was somit den mit der MFM erhaltenen Werten in übertragenem Sinne entspricht.

Das Wasser des Ellerbaches dagegen ist in die poly- bis alpha-mesosaprobe Zone einzuordnen, was auf eine Überlastung durch Abwässer und auf nur geringe Selbstreinigungskraft des Wassers hindeutet. Milzbrandbazillen bzw. Sporen ließen sich weder auf MF-Nährböden noch auf den üblichen Nährmedien nachweisen, wie es auch der Tierversuch bestätigte.

Außer den MF amerikanischer und deutscher Fabrikation wurden bei der Untersuchung des Nahewassers auch deutsche "Coli-5"-Filter verwandt. Die zu untersuchenden Wasserproben wurden mit dem "Coli-5"-Filtergerät filtriert. Anschließend wurden die Filter auf Mc.Conkey-Nährböden (Difco Manual (38)) bebrütet. Auf diesem Nährboden wachsen Colibakterien als rötlich-orangefarbene Kolonien; außerdem wurden Kolonien von gelblichem Farbton beobachtet, diese entsprachen coliformen Organismen. Das Wachstum auf "Coli-5"-Filtern und Mc.Conkey-Nährböden glich fast dem Wachstum auf deutschen "Endo"-Nährkartonscheiben. Eine genauere zahlenmäßige Bestimmung war wegen der Unübersichtlichkeit - keine Quadrateinteilung - nicht möglich. Bei einer Untersuchung in stärkeren Verdünnungsreihen lagen die Kolonienzahlen auch hierbei immer deutlich über denen, die auf amerikanischen Nährkartonscheiben gefunden wurden (s.Tabelle VI).

Auf den MF mit "Endo"-Nährkartonscheiben ließen sich Kolonien von verschiedener Gestalt und Farbe erkennen. So wuchsen neben den mit typischem Bakterium coli-Wachstum-schwarze Kolonien mit glatter Oberfläche und goldgelbem Metallglanz-Kolonien fast gleicher Farbe, nur war die Oberfläche ange-raut und höckerig. Auch ließen sich Wachstumsformen mit matterem Glanz im Zentrum der Kolonie mit geringerer Schleimbildung erkennen. Diese entwickelten sich aber nur auf deutschen Nährkartonscheiben. Weiterhin waren schleimbildende Kolonien von roter Farbe nachweisbar. Wir impften diese Kolonien einzeln auf Leifson- und Mc.Conkey-Agarnährböden (Difco Manual) über. Der Mc.Conkey-Agar dient zum Nachweis der Bakterien der Coligruppe, sowie *S. typhi* und *paratyphi*,

während auf den Leifson-Agar in gewissem Sinne das Wachstum der Colibakterien unterdrückt wird.

	Leifson-Agar	Mc.Conkey-Agar
a) glatte Oberfläche Metallglanz	rötlich-weißlich mäßige Schleimbildung	rötlich
b) höckrige Oberfläche Metallglanz	rötlich-weißlich mäßige Schleimbildung	rötlich Schleimbildung
c) glatte Oberfläche matter Metallglanz Schleimbildung *)	rötlich-weißlich Schleimbildung	rot
d) rote, schleimige Kolonien	rötlich-gelblich	rot

*) wachsen nur auf D- + BG

Tabelle VIII: Differenzierung von Kolonien auf Leifson- und Mc.Conkey-Agar

Dieses Ergebnis spricht dafür, daß nicht sämtliche Kolonien mit Metallglanz auf MF den E.coli oder Bakterien der Coli-gruppe zugehörig sind.

In den Wasserproben des Ellerbaches waren auf den MF, die auf "Endo"-Nährkartonscheiben bebrütet wurden, außer den Kolonien, die früher schon beschrieben wurden, noch gelbliche und farblose Kolonien gewachsen. Ebenso entwickelten sich rote Kolonien mit und ohne Schleimbildung auf diesem Nährboden. Eine weitere Identifizierung durch Überimpfen auf Kligler-Eisen-Agar (Difco Manual) wurde unternommen. Wir beobachteten aerobes und anaerobes Wachstum, Gasent-

Entwicklung, sowie Auftreten von H_2S -Bildung. Bei den Bakterien, die eine H_2S -Bildung erkennen ließen, handelte es sich um Proteus-Bakterien. Weiterhin konnten durch das Wachstum auf Kligler-Eisen-Agar coliverdächtige Kolonien als apathogene Sporenbildner identifiziert werden. Zusammenfassend ist also zu vermerken, daß das Wachstum auf deutschen MF und "Endo"-Nährkartonscheiben mit nur ganz wenigen Ausnahmen bei den angeführten Untersuchungsbeispielen im allgemeinen höher liegt als auf den MF und Nährkartonscheiben amerikanischer Herkunft; ferner dürfen nicht sämtliche mit Metallglanz auftretende Kolonien als E.coli angesprochen werden.

Es erhob sich nun die Frage, ob die höhere Kolonienzahl auf deutschen Nährkartonscheiben gegenüber amerikanischen auf das Filtermaterial oder auf die Nährkartonscheibe zurückzuführen ist. Für diese Untersuchung dienten wiederum als Testbakterien Reinkulturen von E.coli und Bakterium enteritidis (Gärtner), außerdem Gemische beider Bakterienarten. Deutsche und amerikanische MF wurden im Austausch auf amerikanischen und deutsche Nährkartonscheiben vom "Typ-Endo" mit und ohne Brillantgrünzusatz gebracht und umgekehrt.

MF	Nährkartonscheiben				
		D-BG	D+BG	A-BG	A+BG
1) E. coli	D	290		225; 146	20; 2
	A	64; 57		55	
2) Bakt.enter	D		134		
	A	94			67
3) Gemisch 1) u. 2)	D	$\frac{43}{129}=172$	$\frac{36}{144}=180$		
	A				$\frac{19}{20}=39$

Tabelle IX : Kolonienwachstum von Reinkulturen von E.coli und Bakt.enter. und deren Gemische auf deutschen, amerikanischen MF und Nährkartonscheiben und umgekehrt

Augenscheinlich ist, daß diese Tatsache - wie Tabelle IX zeigt - auf die Nährkartonscheiben und weniger auf das MF zurückzuführen ist.

Als letzte Untersuchungsreihe interessierte uns das Wachstum von Bakterien - in unserem Falle wiederum von E.coli - wenn der Bakterienaufschwemmung Chlor beigelegt wird.

Deutsche MF auf "Endo"-Nährkartonscheiben mit Brillantgrün wurden für die Untersuchungsreihe angewandt. Wir setzten zwei Versuchsanordnungen an:

- A) Wir bestimmten die Colizahl in 0,5 ml Wasser (einer Reinkultur in der Verdünnung 1: 1000), das mit 500 cm³ sterilem Aqua dest. vermischt wurde. Nach Zusetzen von 1 Tropfen 12,5 %iger HCl und 0,5 Chlorkalk bestimmten wir nach 5, 10 und 15 Minuten die Gesamtkeimzahl.
- B) Bei der anderen Versuchsanordnung stellten wir die gleiche Bakterienaufschwemmung her, versetzten diesem Gemisch wieder 1 Tropfen 12,5 %iger HCl und 0,5 Chlorkalk. Nach 2 Minuten fügten wir noch 10,0 n/10 Natriumsulfitlösung hinzu. 5, 10 und 15 Minuten später kontrollierten wir ebenfalls die Keimzahl.

In nachfolgender Tabelle X werden die Ergebnisse wiedergegeben:

Colizahl vor dem Versuch: 2290

	Versuch A)	Versuch B)
nach 5 Minuten	1650	2300
nach 10 Minuten	660	2100
nach 15 Minuten	260	1950

Tabelle X : Kolonienwachstum unter Chloreinwirkung

Aus der Tabelle läßt sich ersehen, daß unter der Wirkung von Natriumsulfit die keimabtötende Eigenschaft des Chlors bedeutend abnimmt, d.h. die Bakterienzahl im Versuch B) bewegt sich noch 15 Minuten nach der Chloreinwirkung im Be-

reich der Fehlerbreite. Unterbleibt die Wirksamkeit von Natriumsulfit, so fällt die Keimzahl der Colibakterien innerhalb von 15 Minuten stark ab. Dies weist auf besondere Eignung der MFM für die Untersuchung gechlorter Wässer hin.

VII. Zusammenfassung

Es wird über die geschichtliche Entwicklung der MF, ihrer chemischen, physikalischen und technischen Eigenschaften, sowie über verschiedene Nährböden, insbesondere über Nährkartonscheiben berichtet.

Die MFM wird in die Reihe der klassischen bakteriologischen Untersuchungsverfahren eingeordnet und die Vorteile dieser Technik den sonst gebräuchlichen Testen gegenübergestellt. Die MFM ist den klassischen Untersuchungsmethoden gleichzusetzen.

In einem besonderen Kapitel werden Vergleiche an Hand von Wasserproben des Rheines und der Nahe über die Wachstumsfähigkeit von Bakterien auf inländischen und amerikanischen MF angestellt. Sämtliche Vergleichsuntersuchungen lassen erkennen, daß auf deutschen MF höhere Kolonienzahlen gefunden werden als auf den amerikanischen "Isopor"-Membranfiltern.

Die Untersuchungen wurden mit dem amerikanischen transportablen Filtergerät "Isopor-Water Laboratory" durchgeführt, dessen Handhabung im einzelnen erläutert wurde und wesentliche Vorteile gegenüber den üblichen Wasseruntersuchungsmethoden besitzt. Die höhere Keimzahl und damit Kolonienbildung sind auf die bessere Nährbodeneigenschaft der deutschen Kartonscheiben zurückzuführen. Ein weiterer Vorteil der Membranfiltermethode besteht darin, daß auch Wässer kurz nach der Chlorierung untersucht werden können.

Am Schlusse möchte ich Herrn Professor
Dr. med. H. Kliewe für die Überlassung
des Themas und der Deutschen Forschungs-
gemeinschaft in Bad Godesberg bei Bonn für die
freundliche Zurverfügungstellung des Filterge-
rätes meinen Dank sagen.

Literaturverzeichnis

- (1) GOETZ, A.-TSUNEISHI, N.: "Applikation of Molecular Filter Membranes to the Bacteriological Analysis of water". Journ. Americ. Water Works Ass., Vol.43, 12 (1951)
- (2) KRUSE, H. : "Das Membranfilter in der Wasserbakteriologie". Gesundheits Ingenieur 70/154 (1949)
- (3) KARAKASEVIC, B. : "Bakteriologische Untersuchung des Trinkwassers mit Hilfe der Membranfilter-Methode". Z.Hyg. 140, V (1954)
- (4) MÜLLER, G. : "Städtehygiene". Heft 9 (1952)
- (5) BELING, A.- MAIER, K.H.: "Vom Wasser". XXI (1954)
- (6) HEINEMANN, K. : "DMW"; 124-125 (1955)
- (7) ROGERS, D. E. u. a. : Zbl. Bakter. I. Ref. 159, 10- 12 (1956)
- (8) PLOTHMANN, F. J. : Zbl. Bakter. I. Ref. 154, 18- 24 (1955)
- (9) SERY : Zbl. Bakter. I. Ref. 158, 17- 20 (1955)
- (10) BROSCHEIT, A.- ZIMMERMANN, E.: Arch. Hyg. 137, 450 (1953)
- (11) GOETZ, A., GILMAN, R.H., RAWN, A.M.: Journ. Americ. Water Works Ass. Vol. 44, 6 (1952)
- (12) JANNASCH, H. W. : "Bericht Limn. Flußstation Freudenthal", VII (1956)
- (13) EMMENEGGER, T. : "Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene." Vol. 46, 5 (1955)
- (14) BERGAMINI, F. : "L'Igiene moderna"; Anno II, 1- 2 (1956)

- (15) KABLER, P.W. : Americ. Journ. Public Health,
44, 379 (1954)
- (16) SLANETZT, L.W. - BARTLEY, C.H.:
Zbl. Bakter. I. Ref. 153,
9- 13 (1954)
- (17) OPPENHEIMER, C. : Zbl. Bakter. I. Ref. 153,
9- 13, (1954)
- (18) BUTTIAUX, R. : Zbl. Bakter. I. Ref. 158,
5- 8 (1955)
- (19) SHIPE, E.L. - CAMERON, G.M.:
Zbl. Bakter. Ref. 157,
1 - 6 (1955)
- (20) CLARK, H.F., GELDREICH, E., JETTER, H., KABLER, P.W.:
"The MF in Sanitary Bakterio-
logy". Public Health Report
66, 951 (1951)
- (21) HELMCKE, J. G. : Zbl. Bakter. Orig. 159,
308- 310 (1952/53)
- (22) GOETZ, A. : "Seewage and Industrial Waters".
Vol. 25; 10 (1953)
- (23) TASK GROUP REPORT : Journ. Americ. Water Works Ass.,
Vol. 45, 11 (1953)
- (24) HENNEBERG, G. - CRODEL, B. :
Zbl. Bakter, Orig. 160,
605- 613 (1953/54)
- (25) Standards Methods for the Examination of water, seewage
and Industrial waters; 10th
Edition Amerik. Public. Health
Ass.
- (26) CLARK, H.F., JETTER, H.L., GELDREICH, E.E., KABLER, P.W.:
"Domestic and European MF".
Journ. Americ. Water Works Ass.,
Vol. 44, 1052 (1952)
- (27) SLANETZ, L.W. - BARTLEY, C.H.: siehe unter (16)
- (28) TAYLOR, E.W., BURMAN, N.P., OLIVER, C.W.:
Journ. of the Institution of
Water Engineers. Vol.9, 3(1955)
- (29) MÜLLER, G. : Z.Hyg. 127, 322 (1947)

- (30) KABLER, P.W., - CLARK, H.F.:
Americ. Journ. Public Health,
42, 390- 392 (1952)
- (31) KABLER, P.W. : Americ.Journ.Public.Health,
44, 379 (1954).
- (32) KORS, L. E. : Zbl. Bakter. Ref. 155,
21- 24 (1955)
- (33) Americ. Public.Health Ass.and Americ. Water Works Ass.
(siehe unter (25))
- (34) Technical Bulletin Nr. 15, September 1956
AG-Chemical Company INC,
Pasadena/Calif., Box 65 c.
- (35) EYE, J.D. - GARDNER, J.G. - NEEL, J.F.:
Journ. Americ. Water Works
Ass. 1956, S. 1182
- (36) Technical Bulletin Nr. 16, Oktober 1954, "Isopor-Water
Laboratory" . AG-Chemical
Company Inc., Pasadena/Calif.,
Box 65 c.
- (37) LIEBMANN, H. : Handbuch der Frischwasser-
und Abwasserbiologie, Band I,
Verlag R. Oldenbourg, Mün-
chen 1951
- (38) DIFCO- MANUAL : Difco Labs. Inc.-Detroit, 8th
Edition, 1948
- - - - -

Lebenslauf

Am 30. Januar 1921 wurde ich in Mainz als Sohn des Heinrich Karl Kaster und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Kuhn geboren.

Nach 4-jähriger Grundschule trat ich Ostern 1931 in das humanistische Gymnasium zu Mainz ein und verließ diese Schule Ostern 1940 mit dem Reifezeugnis.

Während des zweiten Weltkriegs diente ich 1940 ein halbes Jahr beim RAD und war seit 1941 einschließlich Gefangenschaft bis 1947 sechs Jahre hindurch im Sanitätsdienst der Luftwaffe eingesetzt.

1940/41 immatrikulierte ich mich für zwei Semester an der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt. Nach Entlassung aus der Gefangenschaft nahm ich im Sommersemester 1947 das Studium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz wieder auf und beendete das Medizin-Studium am 15. Juni 1953 mit dem medizinischen Staatsexamen. Als Pflichtassistent arbeitete ich dann ab 1.9.53 bis 30.11.54 am St. Vincenz-Hospital in Mainz und anschließend einen Monat - Dezember 1954 - am gleichen Hause als Volontärassistent. Für ein Jahr - 1955 - war ich an der Universitäts-Frauenklinik Mainz tätig. Am 1.1.1956 wechselte ich an die Medizinische Klinik der gleichen Universität über. Diese Klinik verließ ich am 10.6.56. Vom 15.6.56 bis 30.3.57 war ich am klinischen Sanatorium für Herz- und Kreislauferkrankungen in Bad Münster am Stein. Seit 1.4.57 befinde ich mich am Tuberculose-Krankenhaus in Heidelberg-Rohrbach als planmäßiger Assistenzarzt.

